

CLONAGEM E EXPRESSÃO DE GENES QUE CODIFICAM LIMONENO HIDROXILASE EM CITROS

LIVIA P. M. **SILVA**¹; MARCO A. **TAKITA**²

Nº 10120

RESUMO

O Instituto Agronômico de Campinas foi responsável pela formação do maior banco de seqüências de citros do mundo através do Programa Institutos do Milênio, do Ministério de Ciência e Tecnologia/ CNPq. Esta base de dados apresenta grande parte dos genes expressos de citros e dão uma ampla visão do genoma expresso deste gênero e outros correlatos. No entanto, sua caracterização é fundamental para a exploração de todo o potencial ainda desconhecido. O objetivo desse trabalho é a clonagem e a expressão de enzimas possivelmente envolvidas na biotransformação do óleo essencial de citros. Assim, foram utilizados DNAs disponíveis no banco de clones do Centro APTA Citros Sylvio Moreira para amplificação dos genes desejados, os quais foram sequenciados e clonados em vetor de expressão.

ABSTRACT

The Instituto Agronômico de Campinas was responsible for the construction of the biggest citrus database sequences of the world through the Programa Institutos do Milênio, of Ministério de Ciência e Tecnologia/ CNPq. This database shows most of the citrus expressed genes and a wide picture of the expressed genome of this genus. However, your characterization is fundamental for the exploitation of all potential still unknown. The purpose of this work is the clone and express possible enzymes involved in biotransformation of citrus essential oil. Thus, available DNAs of the clone databank of the Centro APTA Citros Sylvio Moreira were used for the amplification of the desired genes, which were sequenced and cloned in expression vectors.

1. Bolsista CNPq: Graduação em Bacharelado em Biotecnologia, CCA/UFSCAR, ARARAS-SP,
lipilatti@gmail.com

2. Orientador: Pesquisador, Centro APTA citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis-SP

INTRODUÇÃO

O Laboratório de Biotecnologia de Citros do Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" do Instituto Agronômico de Campinas coordenou recentemente um projeto de seqüenciamento de ESTs de Citros (CitEST - Programa Institutos do Milênio), onde foram obtidas aproximadamente 240 mil seqüências de laranja doce, tangerina e outras plantas pertencentes a gêneros correlatos (Targon e col., 2007), constituindo-se no maior banco de seqüências de citros do mundo gerado em um único laboratório.

A busca por seqüências relacionadas à síntese de terpenos mostrou a presença genes que codificam terpeno sintases (Dornelas e Mazzafera, 2007). Entretanto, nenhum trabalho foi feito buscando genes que codificam enzimas capazes de biotransformar os terpenos. Diante disto, foi feita uma análise no CitEST visando a identificação de P450 com similaridade a limoneno hidroxilases. Estas enzimas, P450, constituem um arsenal importante para vias de biossíntese e detoxificação e, em plantas, são muito mais numerosa que em humanos (Schuler e Werck-Reichhart, 2003).

A busca por estas enzimas resultou na identificação de 38 seqüências com similaridade a limoneno hidroxilases, das quais apenas 3 vieram de bibliotecas de laranja doce, apesar de ser a espécie com maior número de seqüências. Estas seqüências foram clusterizadas e geraram 6 contigs e 7 singlets. Dos contigs, três apresentam tamanho superior a 1Kb e parecem conter a seqüência completa dos genes em análises de Blastx (Atschul e col., 1997). Uma vez que a anotação é basicamente determinada por similaridade com outras seqüências de funções definidas e, muitas vezes, com seqüências que apenas foram anotadas desta mesma forma, a propagação de erros é muito mais do que esperada. Isto faz com que estudos funcionais envolvendo os genes identificados no CitEST sejam realizados de forma a confirmar ou não determinada função, com isto estaremos colaborando com a compreensão do funcionamento dos mecanismos biológicos de citros, especificamente, possibilitando futuramente o que se conhece por engenharia metabólica "preditiva" (Dixon, 2005). Assim, este projeto propõe trabalhos iniciais com estes três contigs que servirão de base para sua caracterização funcional.

O objetivo desse trabalho foi a clonagem de genes codificando limoneno hidroxilases identificadas no transcriptoma de *Citrus* visando expressão em *Escherichia coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foram recuperados do banco do Centro APTA Citros Sylvio Moreira os seguintes clones: CR05-C3-701-038-H05, CR05-C1-102-050-A04 e CR05-

C1-103-011-F04. Estas linhagens foram crescidas em meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) durante a noite. No dia seguinte foi feita um minipreparação de plasmídeos por lise alcalina e purificação utilizando-se da Miniprep Express Matrix (Bio101). Estes plasmídeos foram usados para sequenciamento da extremidade 3' uma vez que apenas a extremidade 5' fora sequenciada quando da construção da biblioteca.

O sequenciamento foi feito utilizando-se BigDye v. 3.1 (Applied Biosystems), segundo protocolo do fabricante. As corridas foram feitas em um sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems).

Paralelamente, foram feitas digestões dos plasmídeos com as enzimas *NdeI*, *BamHI* e *BglII*, para verificar-se a presença na sequência dos insertos.

A partir das sequências geradas e aquelas já disponíveis no banco de dados, foram desenhados dois pares de primers para amplificação das sequências codificantes.

Estes primers foram utilizados para amplificação dos genes em reações de polimerização em cadeia, PCR, utilizando-se *Taq* DNA polimerase (Fermentas). A amplificação foi otimizada a partir da reação básica indicada pelo fabricante.

A amplificação foi otimizada a partir da reação básica indicada pelo fabricante. As condições de ciclização foram: um passo inicial de 45 seg a 95°C, 25 ciclos de 45 seg a 95°C, 45 seg a 60°C, 3 minutos a 72°C, e um passo final de incubação a 72°C por 10 min.

Os amplicons foram purificados utilizando-se o kit GeneClean (Bio101). Estes foram clonados em pJET1.2 (Fermentas) e transformados em *E. coli* DH10B.

Os fragmentos sem alterações foram utilizados para clonagem nos vetores de expressão. Os fragmentos e o vetor pET28a foram clivados com *BamHI* e *NdeI*. Após clivagem os fragmentos foram ligados ao vetor e utilizados para transformação em *E. coli* DH10B. A clonagem foi confirmada através de amplificação em PCR.

Clones contendo inserto foram digeridos com *NdeI* e *BamHI* e os genes utilizados para clonagem em pET28a.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente os três clones foram resgatados do banco de clones e os plasmídeos preparados. Estes plasmídeos foram utilizados para digestão com as enzimas de restrição *NdeI*, *BamHI* e *BglII* para verificação do padrão de digestão do inserto (Figura 1).

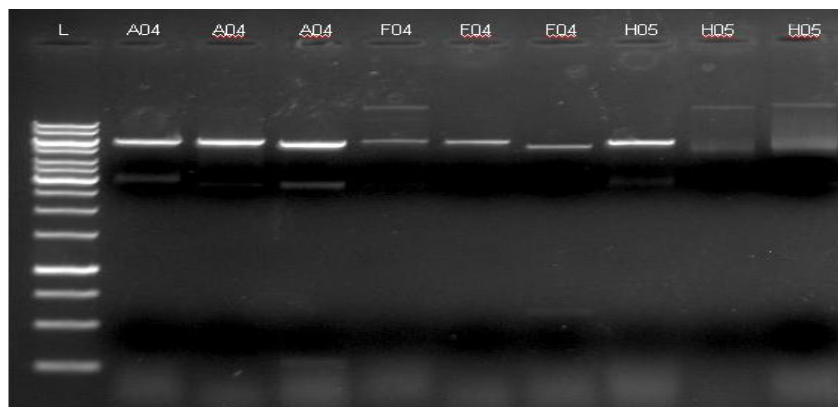


FIGURA 1. Digestão dos clones A04, F04 e H05 com enzimas de restrição. As canaletas 1, 4 e 7 foram digeridas com *Bam*HI; as canaletas 2, 5 e 8, com *Nde*I; e as canaletas 3, 6 e 9, com *Bgl*II.

Os genes que codificam as limoneno hidroxilases foram isolados do vetor utilizando utilizando pares de primers específicos. Com o clone F04 não se obteve amplificação, o A04 foi amplificado com apenas um dos pares de primers e o H05 foi amplificado com os dois pares (Figura 2).

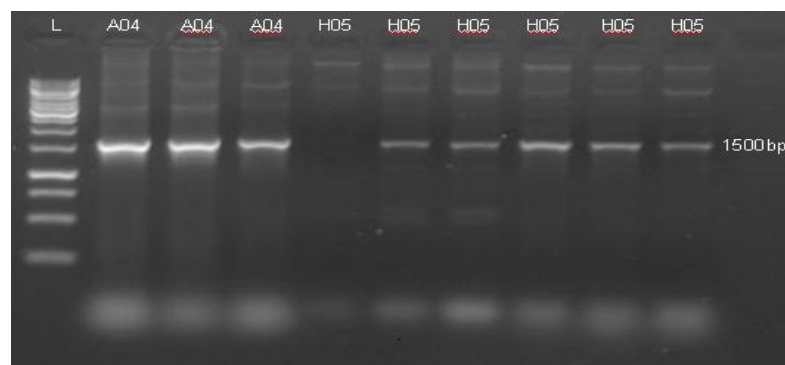


FIGURA 2. Amplificação das minipreparações dos plasmídeos. Minipreparações alcalina para extração dos plasmídeos, seguida de PCR, sendo, na ordem da figura, três colônias A04 amplificadas com PrimerR_Cont11 e Primer1F_C3 e o seis colônias H05, sendo as três primeiras amplificadas com Contig1-FNde e Cont4_RevBam e as três outras com PrimerR_Cont11 e Primer1F_C3.

As bandas foram cortadas, purificadas e clonadas em pJet1.2 e transformadas em *E. coli* DH10B, obtendo duas placas por banda. Em cada uma das placas cresceram cerca de 60 colônias. Foram selecionadas três colônias de cada placa para amplificação com seus respectivos pares de primers. Três colônias com fragmentos A04 foram amplificadas e uma colônia com fragmento H05, ambas com o mesmo par de primers.

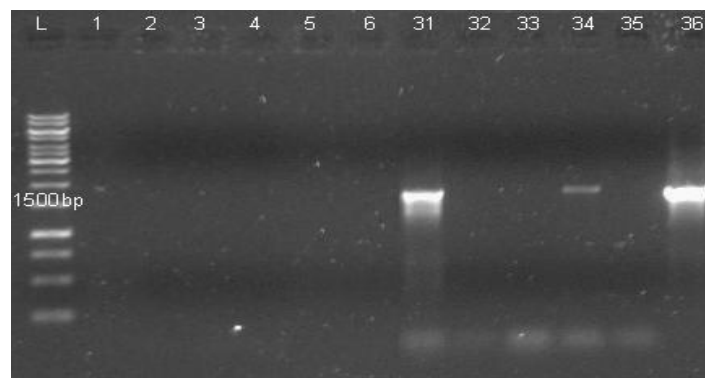


FIGURA 3. Amplificação dos clones. Amplificação dos fragmentos H05 das colônias de 1 a 6 com os primers Contig1-FNde e Cont4_RevBam e amplificação dos fragmentos A04 das colônias 31 a 36 com os primers PrimerR_Cont11 e Primer1F_C3.

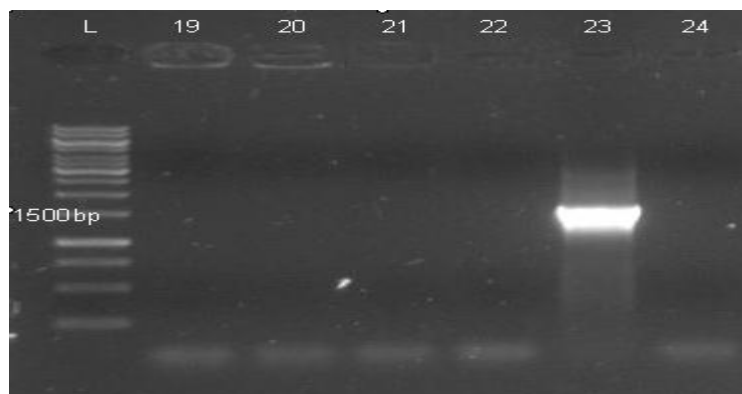


FIGURA 4. Amplificação dos clones. Amplificação dos fragmentos H05 das colônias 19 a 24 com os primers PrimerR_Cont11 e Primer1F_C3.

Foram feitas minipreparações alcalina para a extração do DNA plasmidial e os plasmídeos foram digeridos com *Bam*HI, assim como o vetor pET 28a. Em seguida, fez-se a digestão do fragmento de aproximadamente 5000bp dos plasmídeos das colônias 31, 34 e 36 com *Nde*I. Os fragmentos foram separados em gel de agarose e a banda de aproximadamente 1500bp da colônia 36 (A04) foi cortada e purificada do gel, assim como a banda do pET 28a. Foi feita a ligação entre o fragmento e o vetor e em seguida foi feita transformação em *E. coli* DH10B. Aproximadamente 40 colônias cresceram. Oito colônias foram escolhidas para PCR (Figura 5). Nenhuma delas resultou no fragmento desejado apesar de três amplificarem uma banda de aproximadamente 450 pb.

Outros plasmídeos estão sendo analisados e serão utilizados para transformação da linhagem BL21(DE3) para expressão de proteína.

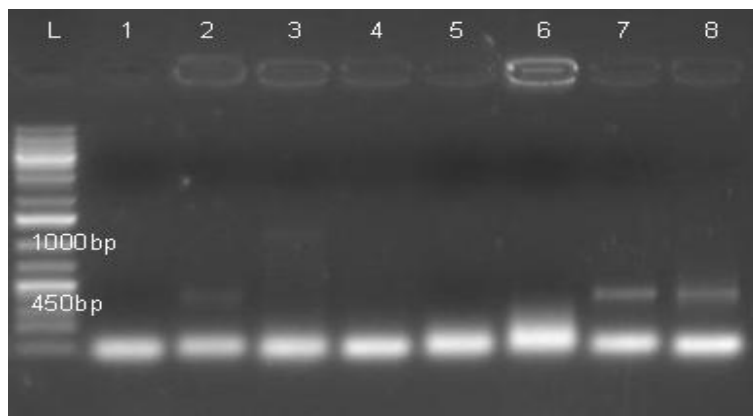


FIGURA 5- Amplificação dos fragmentos de A04 clonados em pET 28a. As reações foram positivas para os clones 2, 7 e 8.

CONCLUSÃO

Este trabalho visa a obtenção de proteínas de citros em sistemas heterólogos. Várias dificuldades foram enfrentadas no transcorrer deste projeto, o que acarretou em atrasos na sua execução. Não foi obtido um clone contendo um dos genes que codificam a P450 para expressão em *Escherichia coli*. Outras sequências estão sendo trabalhadas no mesmo sentido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25, 3389-3402.
- Dixon, R. A. 2005. Engineering of plant natural product pathways. **Curr. Opin. Plant Biol.** 8, 329-336.
- Dornelas, M. C., Mazzafera, P. 2007. A genomic approach to characterization of the Citrus terpene synthase gene family. **Genet. Mol. Biol.** 30 (3) suppl., 832-840.
- Schuler, M. A., Werck-Reichhart, D. 2003. Functional Genomics of P450s. **Ann. Rev. Plant Biol.** 54: 629-667.
- Targon, M. L. P. N., Takita, M. A., Amaral, A. M., Souza, A. A., Locali-Fabris, E. C., Dorta, S. O., Borges, K. M., Souza, J. M., Rodrigues, C. M., Lucheta, A. R.; Freitas-Astúa, J., Machado, M. A. 2007. CitEST libraries. **Genet. Mol. Biol.**, 30 (3) suppl., 1019-1023.